

Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2013

TRÁFICO CELULAR DE MOLÉCULAS

Juan José Aragón Reyes
y María Cascales Angosto



James E. Rothman



Randy W. Schekman



Thomas C. Südhof

El Comité Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo, resolvió conceder el Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2013 a los Doctores James E. Rothman, Randy W. Schekman y Thomas C. Südhof por sus descubrimientos de la maquinaria celular que regula el tráfico de moléculas en el interior de vesículas, el principal sistema de transporte en la célula. Estos tres científicos han resuelto el misterio del sistema de transporte celular. Cada célula es una fábrica que sintetiza moléculas que tiene que exportar. El transporte de estas sustancias se verifica en pequeños corpúsculos, a modo de burbujas rodeadas de membrana, denominadas vesículas. Estos descubrimientos significan un cambio paradigmático en el conocimiento de cómo la célula eucariota, con su compleja compartimentación interna, organiza la ruta de moléculas empaquetándolas en vesículas y enviándolas hacia diversos destinos intracelulares o hacia el espacio extracelular. La especificidad en el envío de este cargamento molecular es esencial para la función y supervivencia celulares, y se requiere, para numerosas funciones, entre ellas, la liberación de neurotransmisores en la región presináptica de una célula nerviosa que transmite una señal a otra célula nerviosa cercana, el envío de hormonas, tales como la insulina, al medio extracelular, etc.

James E. Rothman desentrañó el mecanismo de la maquinaria proteica que permite que las membranas de las vesículas se fusionen con las de sus lugares de destino, para transferir allí el cargamento molecular que llevan en su interior.

Randy W. Schekman descubrió un grupo de genes cuyos productos son requeridos para el tráfico de las vesículas. Thomas C. Südhof ha revelado cuáles son las señales que instruyen a las vesículas para liberar las moléculas que transportan, y ha puesto de manifiesto que el sistema de control de este mecanismo es de una extraordinaria precisión para el transporte y envío de moléculas. Cualquier alteración en este sistema contribuye a enfermedades tales como trastornos neurológicos, inmunológicos, o la diabetes.

James E. Rothman nació en 1950 en Haverhill, Massachusetts, EE.UU. Obtuvo su grado de Doctor en 1976, en la Escuela de Medicina de Harvard. Posteriormente, se incorporó como becario postdoctoral al Instituto de Tecnología de Massachusetts, y en 1978 se trasladó a la Universidad de Stanford en California, donde inició su investigación sobre las vesículas celulares. Rothman ha trabajado también en la Universidad de Princeton, en el Instituto del Cáncer del Memorial Sloan-Kettering Center y en la Universidad de Columbia. En 2008 se trasladó a la Universidad de Yale en New Haven, Connecticut, donde actualmente es profesor y chairman en el Departamento de Biología Celular.

Randy W. Schekman nació en 1948 en St Paul, Minnesota, EE.UU. Estudió en la Universidad de California en Los Ángeles y en la Universidad de Stanford, donde obtuvo su grado de Doctor en 1974, dirigido por Arthur Kornberg (Premio Nobel en 1959), y en el mismo departamento donde Rothman se unió algunos años después. En 1976 se trasladó a la Universidad de California en Berkeley, donde en la actualidad es profesor en el Departamento de Biología Celular y Molecular, y también investigador en el Instituto de Medicina Howard Hughes.

Thomas C. Südhof nació en 1955 en Göttingen, Alemania. Estudió en la Universidad Georg-August en Göttingen, donde se graduó en Medicina en 1982 y obtuvo el doctorado en neuroquímica el mismo año. En 1983, se trasladó a la Universidad de Texas Southwestern Medical Center en Dallas, EE.UU., como becario postdoctoral con Michael Brown y Joseph Goldstein (Premios Nobel en 1985). En 1991, inició sus investigaciones en el Instituto de Medicina Howard Hughes y fue nombrado profesor de Fisiología Celular y Molecular en la Universidad de Stanford en 2008.

■ Transporte de moléculas dentro y fuera de la célula

La célula, con sus diferentes compartimentos denominados orgánulos, se enfrenta al gran problema del transporte de las moléculas que produce. El retículo endoplásmico de la célula sintetiza una serie de moléculas, tales como hormonas, neurotransmisores, citoquinas y enzimas, que tienen que ser enviadas a otros lugares dentro de la propia célula, o sacadas al espacio extracelular. El momento y el lugar de estos intercambios tienen una enorme importancia para la correcta funcionalidad de la célula. Este intercambio se verifica mediante pequeñas vesículas que transportan el cargamento molecular y se fusionan con las membranas de sus objetivos, que pueden ser otros orgánulos celulares o la membrana celular. En este último caso el cargamento molecular se libera al espacio extracelular. El proceso de transporte de moléculas es de gran importancia, ya que desencadena numerosos procesos celulares tales como la activación del impulso nervioso, en el caso de sustancias neurotransmisoras, o el control del metabolismo, en el caso de hormonas. Es importante conocer cómo estas vesículas poseen la información necesaria para enviar el cargamento molecular en el lugar y momento preciso (figura 1).

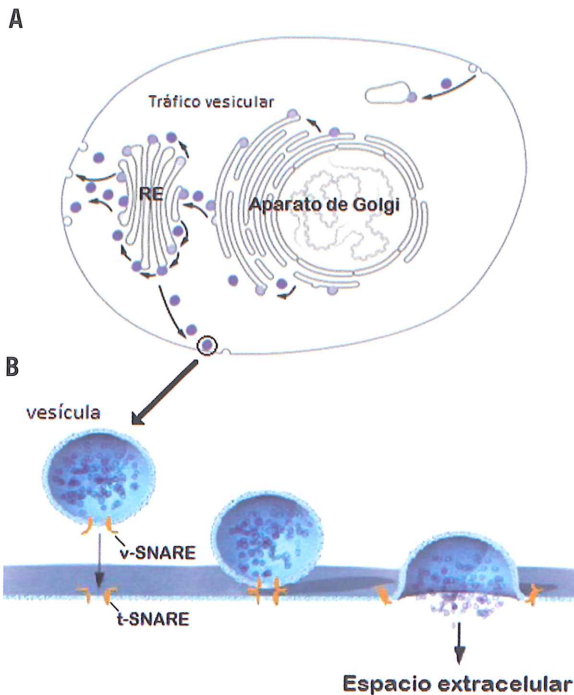


Figura 1. Las células del organismo poseen una organización compleja en la que las funciones celulares específicas están distribuidas en los diferentes compartimentos denominados orgánulos. **A:** las moléculas producidas en la célula se empaquetan en vesículas y se transportan con precisión espacial y temporal a los lugares correctos dentro y fuera de la célula. **B:** complejo proteico (v-SNARE y t-SNARE) descubierto por Rothman, que capacita a las vesículas para fusionarse con sus membranas de destino. Las proteínas de las vesículas, v-SNARE, se unen a proteínas específicas complementarias en la membrana del sitio de destino (“target”), t-SNARE, asegurando que esta fusión se verifica en el lugar correcto y que la carga molecular se entrega en el momento oportuno. (RE, retículo endoplásmico) (Zierathy Lendahl, 2013, modificado).

Randy W. Schekman estaba interesado en la organización del sistema de transporte celular y decidió estudiar sus bases genéticas en los años 1970, utilizando la levadura como sistema modelo. En un análisis genético, Schekman identificó células de levadura con alteraciones en la maquinaria de transporte que daban lugar a un acúmulo intracelular de vesículas, encontrando que la causa de esta congestión era genética, lo que le llevó a identificar los genes alterados. El conocimiento de estos genes y sus productos, proporcionó una nueva panorámica de la maquinaria que interviene en el transporte de las vesículas en las células y de su correcta regulación. El establecimiento de las funciones celulares de las proteínas responsables de este proceso ha sido difícil en sistemas de mamíferos, donde el análisis genético es mucho más complicado que en microorganismos. Por esta razón, y con el objeto de desentrañar la variedad de los productos génicos responsables de la organización y ejecución del transporte intracelular, Schekman y su grupo comenzaron, hace más de treinta años, a aplicar las técnicas de genética microbiana y biología molecular al estudio de estos problemas en un eucariota sencillo, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Hace también más de treinta años, James E. Rothman, investigando la naturaleza del sistema de transporte celular, descubrió un complejo proteico que capacitaba a las vesículas a acoplarse y fusionarse con las membranas de sus células diana. En este proceso de fusión, las proteínas de las vesículas y las de las membranas del destino, se unen entre sí del modo que lo hace una cremallera. El hecho de que tales proteínas sean muchas y que se unan solo en combinaciones específicas, asegura que el cargamento de moléculas transportado por la vesícula se envía a un lugar específico. El mismo principio opera dentro de la célula cuando una vesícula se une a su membrana externa para liberar su contenido al espacio extracelular.

El hecho de que algunos de los genes que Schekman había descubierto en levadura codificaban para proteínas que correspondían a las que Rothman había identificado en mamíferos, llevó a revelar el origen evolutivo del sistema de transporte y permitió que ambos determinaran los componentes críticos de la maquinaria de transporte celular.

Por otro lado, Thomas C. Südhof se interesó en el problema de la comunicación entre las células nerviosas en el cerebro. Las moléculas señalizadoras, los neurotransmisores, son liberados a partir de las vesículas que se fusionan con las membranas externas de las células nerviosas, utilizando la maquinaria molecular descubierta por Rothman y Schekman. Pero a estas vesículas solo se les permite

liberar su contenido cuando la célula nerviosa emite señales a sus vecinas. ¿Cómo se controla esta liberación de manera tan precisa? Südhof encontró la respuesta en los iones calcio y consiguió identificar la maquinaria molecular que responde a un influjo de Ca^{++} , dirigiendo a las proteínas vecinas a unirse rápidamente a las vesículas de la membrana externa de la célula nerviosa. La cremallera antes citada se abre y las sustancias señalizadoras se liberan. El descubrimiento de Südhof explicó cómo se consigue la precisión temporal, y cómo el contenido de las vesículas puede ser liberado de manera precisa y ordenada.

Los tres laureados con el Nobel 2013 han descubierto un proceso fundamental en la biología celular, que ha tenido un impacto importante en el conocimiento del transporte de la carga molecular en el momento justo, dentro o fuera de la célula. El transporte y fusión de las vesículas opera con los mismos principios generales en organismos tan diferentes como levadura y humanos. El sistema es crítico para una variedad de procesos fisiológicos en los cuales la fusión de las vesículas ha de estar controlada, y se distribuye ampliamente desde la señalización en cerebro a la liberación de hormonas y citoquinas inmunes. La alteración en la formación y transporte de las vesículas trae consigo una variedad de enfermedades neurológicas, inmunológicas y metabólicas. Sin esta organización tan extraordinariamente precisa la célula podría entrar en caos.

■ Procesos que controlan la fusión vesicular

Thomas C. Südhof comenzó a estudiar el control de la función de la vesícula sináptica. Rothman y Schekman habían proporcionado la maquinaria fundamental para la fusión vesicular, pero faltaba ahora encontrar cómo se controlaba espacial y temporalmente esa fusión vesicular. Las fusiones vesiculares tienen que ser ejecutadas con alta precisión en respuesta a estímulos específicos. El campo de la neurofisiología tuvo importantes avances con los descubrimientos de Bernard Katz, Ulf von Euler y Julius Axelrod (Premios Nobel 1970), concernientes a los transmisores humorales en los terminales nerviosos y el mecanismo para su almacenamiento, liberación e inactivación. Südhof estaba intrigado por la rápida exocitosis de las vesículas sinápticas, la cual estaba bajo un estricto control temporal, regulada por los cambios en la concentración citoplasmática de calcio libre. Südhof observó el papel del calcio como regulador de la liberación de los neurotransmisores en las neuronas y descubrió que dos proteínas, la complexina y la sinaptotagmina, eran críticas en la fusión vesicular mediada por calcio.

La complexina compete con SNAP, una proteína asociada a sinaptosoma, por el receptor al que se une SNAP, acción que no ejerce la sinaptotagmina. Las neuronas de ratones *knockout* para la complexina, mostraron una eficiencia muy reducida en la liberación de transmisores debido a la menor sensibilidad al calcio del proceso de secreción sináptica. Esto revelaba que la complexina actúa en una etapa tardía en la fusión sináptica, como mecanismo de sujeción que previene la fusión constitutiva y permite que se verifique la exocitosis de forma regulada. Südhof descubrió que la sinaptotagmina-1 interviene acoplando el calcio a la liberación del neurotransmisor. La sinaptotagmina-1 interactúa con fosfolípidos de manera dependiente de calcio, como también lo hace con la syntaxina-1 y con los receptores SNARE descubiertos por Rothman. Südhof estableció que la sinaptotagmina-1 ejerce un papel como sensor del calcio para la rápida fusión sináptica, demostrando que la unión del calcio a esta proteína, participa en el desencadenamiento de la liberación de neurotransmisores en la sinápsis. Por otra parte, Südhof también caracterizó el gen *Munc18-1*, que se corresponde con el gen *sec-1*, descubierto por Schekman y de ahí recibe su nombre la proteína SM (Sec/Munc), encontrando que Munc18-1 interacciona con la syntaxina y que abraza más tarde al complejo trans-SNARE. Se sabe ahora que las proteínas SM son una parte integral del complejo proteico implicado en la fusión de las vesículas, junto con las proteínas SNARE. Südhof también demostró que la delección de Munc18-1 en ratón producía una pérdida completa de la secreción de neurotransmisores a partir de las vesículas sinápticas. Igualmente realizó descubrimientos críticos importantes en el conocimiento del control en espacio y tiempo de la fusión de las vesículas y desentrañó las vías dependientes del calcio que regulan la liberación de los neurotransmisores en la sinapsis (figura 2).

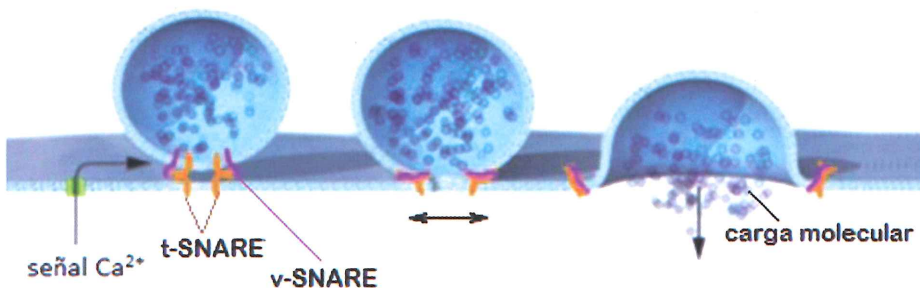


Figura 2. Los estudios de Südhof han demostrado cómo se verifica la transmisión de señales de una célula nerviosa a otra en el cerebro y cómo el calcio controla este proceso. Estos estudios identificaron la maquinaria molecular sensible a los iones calcio, que convierte esta información a lo que corresponde a la fusión vesicular, y explica cómo se consigue la precisión temporal para que las vesículas puedan liberarse de su carga molecular (Zierath, y Lendahl, 2013, modificado).

■ Fundamentos básicos del transporte vesicular

Una de las características que definen a la célula eucariota es su capacidad de mantener un grupo diverso de compartimentos intracelulares con distintos componentes o proteínas, de manera que las sustancias puedan ser transportadas desde un compartimento a otro, sin que el compartimento pierda su identidad única. Como hemos visto, el transporte de estos componentes se realiza mediante vesículas que brotan a partir del compartimento donador. El brote de una vesícula y su transporte para fusionarse con el orgánulo de destino, están mediados por diversas familias de proteínas. Un grupo de proteínas, las denominadas SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), se encuentran implicadas en el mecanismo que media la fusión de las dos membranas y asegura que las vesículas envíen su carga hacia el compartimento correcto. Las proteínas SNARE tienen características estructurales helicoidales y son importantes en la definición de la especificidad respecto a sitios de destino de las vesículas.

Proteínas SNARE, el corazón de la fusión de membranas

Las células se encuentran rodeadas por una bicapa lipídica, la membrana plasmática, que la separa del medio circundante. Además de esta membrana, las células eucariotas poseen corpúsculos u orgánulos intracelulares, también rodeados de membranas lipídicas internas, que demarcan los diversos compartimentos intracelulares: el retículo endoplásmico, el aparato de Golgi, las mitocondrias y los lisosomas, entre otros. Estos compartimentos se encuentran especializados en la ejecución de determinadas funciones, tales como síntesis de proteínas, hidrólisis de proteínas, reacciones metabólicas, etc. La presencia de tales compartimentos u orgánulos y su especialización funcional constituyen características fundamentales de las células eucariotas, que las distinguen de las células procariotas tales como las bacterias. Las ventajas evolutivas que ofrece esta compartimentación celular se refleja en la gran variedad de células eucariotas que existen en la naturaleza, que van desde la levadura hasta las neuronas. La mayoría de las funciones específicas de cada orgánulo intracelular son ejecutadas por proteínas que residen en su interior o en la membrana. Se requiere, por tanto, el transporte de estas proteínas y de sus sustratos hasta los compartimentos correspondientes. Este transporte corre a cargo de vesículas lipídicas que se forman en un compartimento y se fusionan en otro, cediendo su carga molecular en este último. Por ejemplo, las proteínas que han de residir en la membrana del aparato de Golgi, se sintetizan en

los ribosomas y se insertan, primero en la membrana del retículo endoplásmico, luego se “empaquetan” en el interior de las vesículas que se forman en el retículo endoplásmico y por último, estas vesículas portadoras de la carga molecular se trasladan hacia su destino, se fusionan con la membrana del aparato de Golgi y ceden las moléculas que transportan al interior de dicho aparato.

En otros procesos operan mecanismos similares. Por ejemplo, en la secreción al medio extracelular de pequeñas moléculas con funciones diversas, se encuentra la liberación de neurotransmisores para la comunicación entre neuronas y para el funcionamiento del cerebro. Los neurotransmisores se empaquetan a elevadas concentraciones en el interior de vesículas lipídicas que se forman en los terminales presinápticos de las neuronas, liberándose posteriormente mediante la fusión de las membranas de estas vesículas con la membrana plasmática (exocitosis). Los neurotransmisores liberados se unen, entonces, a receptores alojados en las membranas de otras neuronas próximas, iniciándose de esta manera una respuesta en las mismas. Estos y otros ejemplos indican que los procesos de fusión de membranas intracelulares constituyen una gran parte de la biología de las células y de los organismos que las poseen.

Desde el descubrimiento de las proteínas SNARE por Rothman, estas proteínas han sido reconocidas como los componentes clave de los complejos proteicos que gobiernan la fusión de las membranas. A pesar de la considerable divergencia en las secuencias de las proteínas SNARE, su conservado mecanismo se adapta a reacciones de fusión tan diversas como las implicadas en el crecimiento celular, reparación de membranas, citoquinesis y transmisión sináptica.

Descubrimiento y estructura de las proteínas SNARE

Las investigaciones pioneras de George Palade en los años 1960 establecieron la vía secretora y su conexión con la biogénesis de orgánulos, como una vía importante en la biología de los eucariotas (Palade, 1975). Sus discípulos continuaron con los descubrimientos morfológicos en un nivel de análisis que implicaba el fraccionamiento subcelular y la reconstitución bioquímica para comprender los mecanismos de la síntesis de las proteínas secretoras y su traslocación. Sin embargo, a final de los años 1970 aún se sabía poco acerca de la identificación de las proteínas requeridas para la organización y ejecución de la vía secretora. Otros intentos sobre análisis genéticos en *Paramecium* para descubrir las proteínas re-

queridas en la secreción, no tuvieron éxito debido a que las entonces rudimentarias y complicadas técnicas de clonación, limitaban la utilidad de este sistema.

Fue en los años 1980, cuando se caracterizaron las proteínas SNARE y se identificaron como elementos clave en la fusión de las membranas. Aunque con alguna que otra discrepancia, hoy se considera que estas proteínas median la fusión de las membranas en todas las etapas transportadoras de la vía secretora a través de un modelo molecular apoyado por numerosas evidencias. De acuerdo con este modelo, las proteínas SNARE, que se localizan en membranas opuestas, promueven la fusión de las membranas utilizando la energía libre liberada durante la formación de un haz de cuatro hélices alfa. La formación de estos haces conduce a una estrecha conexión de las membranas destinadas a fusionarse, lo que inicia su fusión. El reciclaje de las SNARE se consigue mediante la disociación del agrupamiento de las hélices, mediada por la proteína AAA+ NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), una ATPasa.

Las proteínas SNARE están compartimentadas y orientadas en el citoplasma, de forma que se emparejan en las membranas de manera específica. Para llegar a desentrañar su papel, Rothman partió de la hipótesis “SNARE”, cuya base original fue el descubrimiento de un complejo estequiométrico consistente en una v-SNARE y una t-SNARE (v- de vesícula y t- de *target*, diana o destino), junto con las proteínas de fusión citoplasmáticas SNAP y NSF. Posteriormente se estableció que las v- y t-SNARE forman su propio complejo estable en ausencia de SNAP y NSF. Muchas v- y t-SNARE se han caracterizado en levadura, plantas y animales. Los miembros de la familia SNARE se localizan de manera selectiva en compartimentos celulares tales como el retículo endoplásmico, membranas nucleares, aparato de Golgi, endosomas, lisosomas, vesículas secretoras de almacenamiento y membranas plasmáticas apicales y basolaterales, siendo requeridas para eventos de fusión que implican a los compartimentos en los cuales se localizan.

Las proteínas SNARE forman una superfamilia de proteínas pequeñas con 25 miembros en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, 36 miembros en humanos y 54 miembros en la crucífera *Arabidopsis thaliana*. Poseen una estructura de dominios simples y un motivo característico SNARE, evolutivamente conservado, de 60–70 aminoácidos dispuestos en heptadas repetidas. En su región C-terminal, la mayoría de estas proteínas poseen un dominio transmembrana unido al motivo SNARE mediante una conexión corta al extremo carboxilo, mientras que al extremo amino de dicho motivo pueden añadirse diversos dominios que constituyen la principal

fuente de variabilidad entre las proteínas SNARE. Existen, no obstante, algunas excepciones a este patrón estructural. Es el caso de las brevinas, que carecen de dominio aminoterminal, o de SNAP-25 una SNARE neuronal que carece de dominio transmembrana, pero que posee dos motivos SNARE unidos por un región conectora palmitoilada que posibilita su anclaje a las membranas celulares (figura 3).

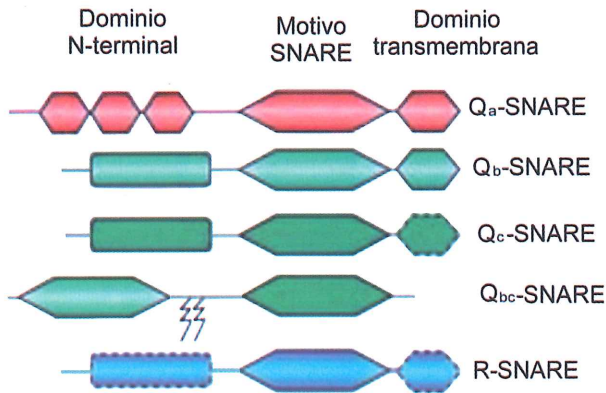


Figura 3. Estructura de las proteínas SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor –NSF– attachment protein receptor). Organización de los dominios en las distintas familias o tipos de proteínas SNARE (Qa, Qb, Qc, Qbc y R). Aquellas regiones limitadas por líneas discontinuas representan dominios cuya presencia no es constante en todos los miembros de la familia (Fasshauer et al., 1998, modificado).

Motivos SNARE

La formación del complejo de fusión de las proteínas SNARE en las membranas que van a fusionarse, está mediada por los mencionados motivos SNARE. Estos motivos carecen de una estructura definida en los monómeros de las proteínas; sin embargo, cuando las proteínas SNARE entran en contacto, sus motivos SNARE adoptan espontáneamente la conformación de complejos de extraordinaria estabilidad constituidos por 4 hélices alfa entrelazadas o superhélices, en los que cada hélice corresponde a un motivo SNARE diferente: sinaptobrevina/VAMP, syntaxina y SNAP-25 (figura 4A). En el interior del haz formado por estas 4 hélices alfa se sitúan 16 capas o anillos (numerados desde –7 hasta +8, comenzando por el extremo amino), integrados por las cadenas laterales de aminoácidos pertenecientes a los distintos motivos SNARE. Estos anillos son de carácter hidrofóbico, con la excepción del anillo en posición media, donde existe una capa iónica (capa «0»), poco frecuente, que contiene tres residuos de glutamina (Q) de la syntaxina y uno de arginina (R) de la sinaptobrevina (figura 4B). Atendiendo a la presencia de estos aminoácidos, las proteínas SNARE se clasifican en Q y en R. A su vez, dependiendo de la posición del motivo SNARE en el seno de la proteína, las SNARE Q se subdividen en Qa, Qb y Qc y Qbc, debiendo asociarse siempre en combinaciones heteroméricas planas (QaQbQcR o QaQbcR) y disponerse de forma paralela para poder constituir

complejos productivos capaces de inducir la fusión de las membranas. Como ya se ha mencionado, el dominio aminoterminal de la proteína SNARE conforma la región de mayor variabilidad, cumpliendo funciones diversas entre las que se encuentran la de plegarse sobre el motivo SNARE, forzando una conformación “cerrada” de la proteína (sintaxina), que impide su participación en los complejos de fusión, y la de mediar la interacción con proteínas como las SM. La formación del complejo de fusión tiene lugar, probablemente, en dos etapas, consistentes en la formación de un complejo intermediario QaQbQc en la membrana plasmática y la posterior asociación con una SNARE R vesicular. Este ensamblaje secuencial se vería favorecido por el hecho de que las proteínas SNARE Q no se distribuyen uniformemente en la membrana plasmática, sino que se agrupan en regiones ricas en colesterol sobre las que las vesículas SNARE R tenderían a fijarse, lográndose, en consecuencia, una mayor eficiencia en los procesos de fusión de membranas.

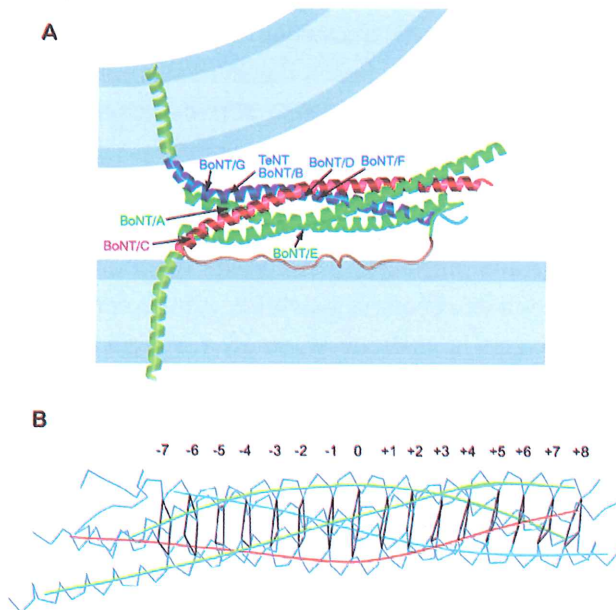


Figura 4. A. Estructura tridimensional del complejo de fusión neuronal en configuración trans obtenida mediante análisis de difracción de rayos X. El complejo adopta la forma de un cilindro de 120 Å de longitud y diámetro trasversal variable formada por los motivos SNARE de la sinaptobrevina 2 (azul), la sintaxina 1 (rojo) y SNAP-25 (verde). Se muestran también los lugares de actuación de las toxinas clostridiales: tetánica (TeNT) y botulínicas (BoNT/) A, B, C, D, E, F y G. (Sutton et al., 1998). **B.** Esquema de la porción central del complejo de fusión mostrando las 16 «capas» formadas por las cadenas laterales de los aminoácidos de los motivos SNARE dispuestas a ambos lados de una capa central «0». En negro se muestra el eje de la superhélice y en azul, rojo y verde las hélices de la sinaptobrevina, la sintaxina 1 y SNAP-25, respectivamente (Fasshauer et al., 1998).

Las proteínas Rab intervienen en la especificidad de unión de las vesículas de transporte con la membrana receptora. Una GEF (proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina) de la membrana donadora, reconoce a una proteína Rab específica y la induce a intercambiar el GDP por el GTP. La unión al GTP altera la conformación de la Rab, exponiendo su grupo lipídico unido covalentemente, el cual produce el anclaje de la proteína a la membrana. La Rab-GTP permanece unida a la superficie de la vesícula después de que esta se separa de la membrana donadora y se une a efectores Rab de la membrana receptora. La proteína Rab y los efectores contribuyen al anclaje de la vesícula y por lo tanto al apareamiento de las proteínas v-SNARE y t-SNARE. Después de la fusión de la vesícula con la membrana receptora, la proteína Rab hidroliza su GTP liberándose al citoplasma como Rab-GDP, desde donde puede ser reutilizada en una nueva ronda de transporte.

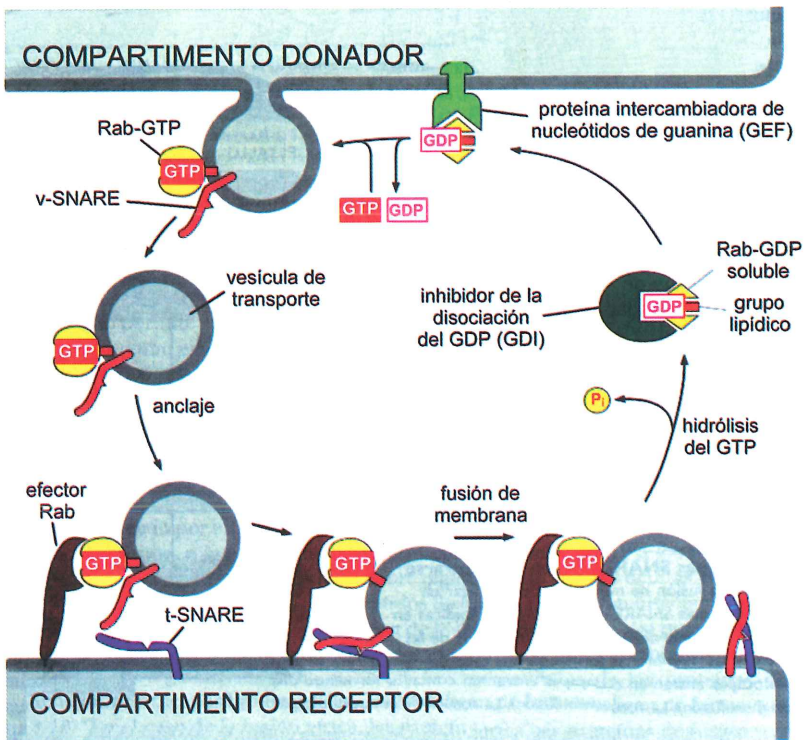


Figura 6. Intervención de las proteínas Rab junto con las proteínas SNARE en la unión de las vesículas de transporte con la membrana receptora o de destino. Se muestra cómo las proteínas Rab se unen a la vesícula formada en el compartimento donador, cómo contribuye a continuación al anclaje de la vesícula liberada al compartimento de destino, y tras la liberación de los componentes que porta la vesícula, vuelve de nuevo hacia la formación de nuevas vesículas en el compartimento donador (www.jolugar.webs.ull.es). El papel de las diversas proteínas se describe en el texto.

Rab-GDP en el citoplasma está unida a un inhibidor de la disociación de GDP (GDI) que impide que Rab pueda liberar el GDP hasta que haya interactuado con las proteínas apropiadas de la membrana del compartimento donador (figura 6).

Formación, fisión, transporte y fusión de las vesículas

El tráfico vesicular de proteínas está sujeto a estrictos mecanismos de control. Existen complejos proteicos que se adosan a membranas específicas y proporcionan la fuerza mecano-química que provoca la curvatura de membrana necesaria para generar una vesícula de transporte. La formación de una vesícula transportadora no es un proceso espontáneo y requiere un aporte de energía. Las células eucariotas han desarrollado una variedad de complejos proteicos conocidos como cubiertas que han sido diseñadas para este propósito.

En esencia, las cubiertas de las vesículas polimerizan en la superficie de la membrana del compartimento de origen (donador), induciendo simultáneamente la recolección del cargamento de moléculas en la vesícula en formación y proporcionando, al menos, una parte de la fuerza conductora para deformar un segmento de la membrana donadora para formar la vesícula. Se han identificado diversos sistemas de recubrimiento, cada uno de ellos con arquitectura y propiedades dinámicas únicas. Las distintas propiedades estructurales y mecánicas de los sistemas de recubrimiento derivan de su uso en las etapas específicas de la red del tráfico vesicular. Por ejemplo, el sistema de recubrimiento con clatrina parece ser que se emplea en una rama de vías endocíticas, donde el material del exterior de la célula se internaliza, y en las últimas etapas de las vías exocíticas, donde el material se transporta desde dentro de la célula hacia el exterior. Por el contrario, el sistema COP-I se utiliza en el aparato de Golgi para formar vesículas de transporte retrógrado, y el sistema en el retículo endoplásmico para formar vesículas de transporte anterógrado.

Por tanto, los complejos generadores de la cubierta de las vesículas que se conocen hasta el momento son: la clatrina, en la red *trans* Golgi (TGN) y en la membrana plasmática; el complejo COP-I, en el aparato de Golgi; y el complejo COP-II, en el retículo endoplásmico. Estos complejos proteicos contienen elementos que reconocen las señales de destino presentes en las moléculas que serán transportadas, seleccionándolas para entrar en una vesícula de transporte en el momento de su formación. La vesícula de transporte también incorpora una parte de un complejo de fusión (v-SNARE), que al interactuar con su contraparte presente

en la membrana objetivo (t-SNARE) determina su fusión con esa y no con otra membrana. Diversas proteínas GTPasas aportan eventos reguladores importantes para la vectorialidad y especificidad del transporte vesicular.

La polimerización de la cubierta no es suficiente para completar el proceso de formación de la vesícula. El abombamiento de la membrana mediante la unión de la cubierta finaliza inevitablemente con la formación de un cuello estrecho de membrana que conecta la vesícula en formación a la membrana donadora. La escisión de este cuello de membrana se requiere para la liberación de la vesícula de transporte. El proceso de ruptura de la membrana se denomina “fisión” y requiere una familia de proteínas altamente especializadas que reconoce, envuelve y corta el cuello de membrana utilizando la energía libre de la hidrólisis del GTP o ATP. La dinamina es el miembro de esta gran y esencial familia de maquinarias cortantes.

Estos procesos son comunes a todos los tipos de vesículas. El proceso global se representa en la figura 7.

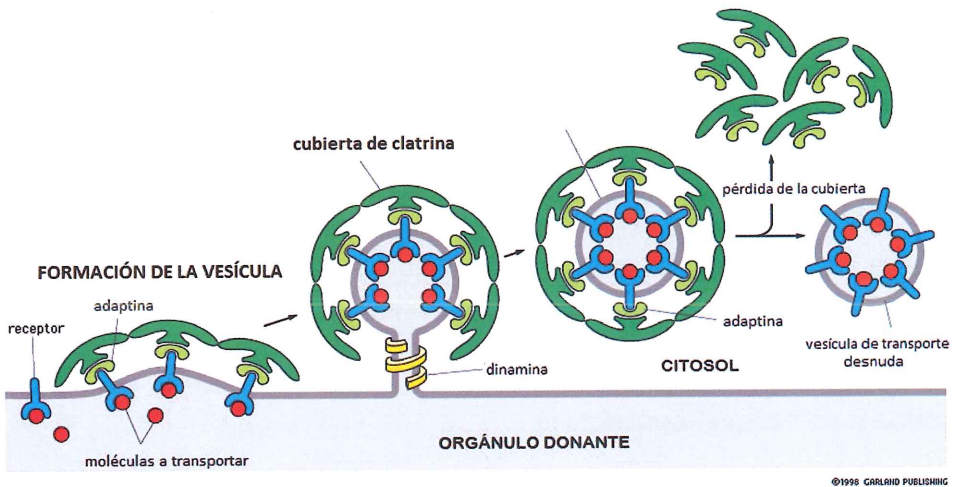


Figura 7. Formación de vesículas revestidas de clatrina. Este proceso requiere la interacción de varios componentes: el receptor de la carga molecular, la adaptina, la proteína de revestimiento (COP o clatrina) y la dinamina. El punto esencial es que la proteína de revestimiento trae consigo la formación del brote y la concentración de la carga proteica (Garland Pub, 1998).

El proceso completo comprende:

- La proteína de revestimiento (clatrina) forma la configuración de la curva de la membrana del compartimento donador. Este es el resultado de la interacción de las moléculas proteicas de revestimiento, unas con otras, para formar un pliegue en la membrana donadora.
- Las moléculas que van a ser transportadas son recogidas por un receptor específico que es una proteína transmembrana, cuyo lugar de unión de las moléculas se encuentra en el lado del lumen de la proteína.
- El complejo receptor/molécula es reconocido por la adaptina y se combina con su cara citoplasmática.
- El compuesto moléculas/receptor/adaptina se combina con la proteína de revestimiento en la superficie citoplasmática. Esto es muy importante para la correcta selección y concentración del cargamento de moléculas. Las moléculas de revestimiento, a su vez, tienen sitios de unión para la adaptina (receptores) y carga molecular. Esto proporciona una concentración de moléculas en el área donde la vesícula se está formando.
- La dinamina constriñe el cuello de la vesícula y la arranca. Este es un proceso dependiente de ATP.
- Después de desprendida, la vesícula pierde la cubierta y está lista para el transporte.
- El transporte de las vesículas en distancias cortas se realiza por difusión, y en caso de distancias largas se realiza a través de los microtúbulos movidas por proteínas motoras.

Reconocimiento de las vesículas y especificidad del transporte vesicular

La unión ha de ser específica. Como se ha mencionado anteriormente, la especificidad viene asegurada por la intervención de las proteínas SNARE v y t, que están incorporadas, la primera, a la membrana vesicular formada en el orgánulo donante, y la segunda a la membrana del compartimento de destino, verificándose la unión por la interacción específica entre ambas proteínas (figura 8).

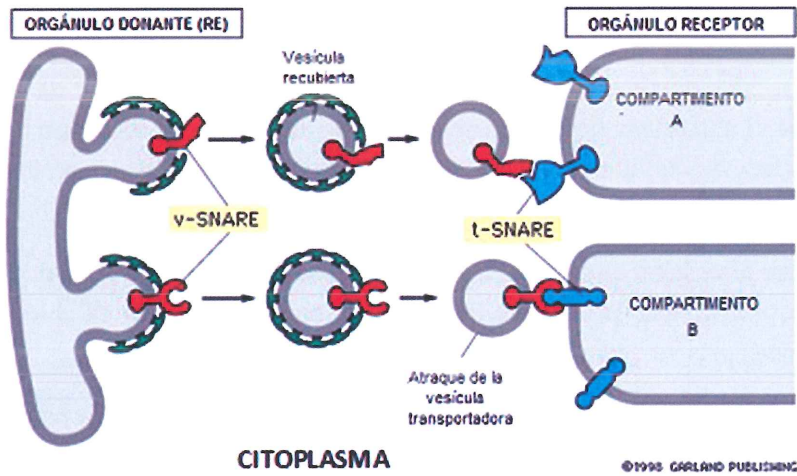


Figura 8. Las vesículas se forman a modo de brote en la membrana del orgánulo donante RE (retículo endoplásmico), llevando anclado en su membrana a v-SNARE. La vesícula desprendida y recubierta, viaja a través de los microtúbulos celulares hacia el orgánulo receptor. Una vez que ha perdido la cubierta, se inserta en el compartimento receptor, o de destino, mediante la unión de v SNARE y t SNARE (Garland Pub, 1998).

Una vez que la vesícula entra en contacto con la membrana de destino, varias proteínas del “complejo de fusión” se unen para fusionar las membranas (figura 9).

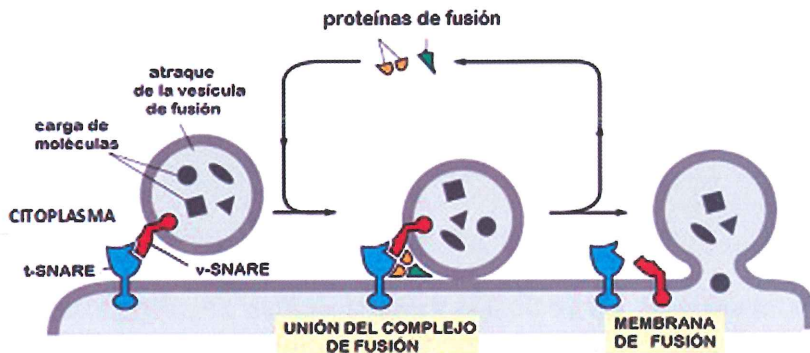


Figura 9. Fusión de la vesícula de transporte. Después de la unión de la vesícula de transporte con la membrana del destino, un complejo proteico de fusión de membranas se reúne en el sitio de unión y cataliza la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana del lugar de destino.

En resumen, el transporte vesicular se realiza en tres etapas:

a) Selección del cargamento molecular: diversas proteínas adaptadoras se acoplan con las señales de moléculas específicas de la maquinaria de transporte.

b) Formación de la vesícula: las proteínas del revestimiento promueven la formación de la vesícula de transporte a partir de la membrana del compartimento donador, y una vez formada, la desprenden (fisión) y liberan. Una notable variedad de revestimientos facilita la formación de la vesícula a partir de diferentes compartimentos exocíticos y endocíticos.

c) Reconocimiento y fusión final de la vesícula con el compartimento de destino. Diversas proteínas de reconocimiento y fusión asociadas a las membranas dirigen la vesícula de transporte al correcto compartimento de destino.

■ El tráfico de vesículas y su importancia en medicina

Las investigaciones de Rothman, Schekman y Südhof han desentrañado secretos de la maquinaria esencial para encaminar la carga molecular en células procedentes de organismos tan distantes como la levadura y el hombre. Estos descubrimientos han tenido gran impacto en nuestro conocimiento de cómo las moléculas se disponen en los lugares precisos en la célula. A la luz de estos conocimientos, no es sorprendente que las alteraciones en cualquiera de las muchas etapas de esta maquinaria que controla el transporte y fusión de estas vesículas, se asocien con la enfermedad.

El transporte y fusión de las vesículas es esencial para diversos procesos fisiológicos que van desde el control de la comunicación entre células nerviosas en el cerebro hasta la respuesta inmunológica y hormonal. La alteración de este sistema de transporte se asocia lógicamente con enfermedades de distinto tipo. Por ejemplo, enfermedades metabólicas tales como la diabetes tipo 2, se caracterizan por alteraciones tanto en la secreción de insulina a partir de las células beta del páncreas, como en la translocación del transportador de la glucosa mediado por insulina en músculo esquelético y tejido adiposo. Por otro lado, las células inmunes dependen del tráfico funcional de las vesículas para el envío de citoquinas y moléculas inmunológicas efectoras, que median las respuestas inmunes innata y adaptativa.

Además de estas conexiones generales entre la fusión vesicular y la enfermedad, se han descubierto mutaciones específicas en genes que codifican las proteínas implicadas en la maquinaria de fusión, que dan lugar a un número de enfermedades. Por ejemplo, se han descrito que ciertas formas de epilepsia se deben a mutaciones en el gen que codifica la proteína MUNC-18-1. También, en un grupo de pacientes que sufrían de Linfocitosis hemofagocítica familiar (FHL), se han encontrado mutaciones en los genes que codifican las proteínas MUNC13-4, MUNC18-2 y syntaxina-11. En estos pacientes, las llamadas células naturales asesinas (NK) fracasan al no poder regular apropiadamente sus funciones, lo que ocasiona hiperinflamación, a veces letal. También ciertas toxinas bacterianas se fijan a la maquinaria de fusión vesicular. El botulismo causado por la bacteria anaeróbica *Clostridium botulinum*, es una enfermedad que produce parálisis y la mayoría de toxinas se fijan a SNAP-25, VAMP/sinaptobrevina y syntaxina, e inhiben la liberación de acetilcolina en la unión neuromuscular. La neurotoxina tetánica de *Clostridium tetani* actúa sobre VAMP/sinaptobrevina en las interneuronas inhibitorias y bloquea la liberación de GABA o glicina produciendo una parálisis espástica (figura 4). Por tanto, Rothman, Schekman y Südhof con sus investigaciones, han aclarado los mecanismos de estas enfermedades proporcionando la posibilidad de tratamientos prospectivos.

■ Conclusiones

Los descubrimientos de James E. Rothman, Randy W. Schekman y Thomas C. Südhof han puesto de manifiesto algunos de los procesos fundamentales en el funcionamiento de las células eucariotas, procesos que aseguran el intercambio de las moléculas de manera correcta. Estos hallazgos han tenido un impacto extraordinario, pues han hecho conocer cómo se verifica la comunicación celular mediante el envío de moléculas a sus destinos específicos, dentro y fuera de la célula. El transporte y fusión de las vesículas opera con los mismos principios generales en organismos tan diferentes como la levadura y el hombre. Es crítico para una gran variedad de situaciones fisiológicas en las cuales la fusión vesicular ha de ser controlada en multitud de procesos. Sin esta organización exquisita y precisa la célula sería incapaz de mantener su función.

■ Agradecimientos

Queremos expresar nuestro reconocimiento a la inestimable ayuda prestada por Doña Adoración Urrea Salazar en la búsqueda de bibliografía y preparación de figuras.

■ Abreviaturas

COP I y II, proteínas de la cubierta I y II; GABA, gamma aminobutirato; GDI, inhibidor de la disociación de GDF; GDF, proteína intercambiadora de nucleótidos de guanina; GDP, guanosina difosfato; GTP, guanosina trifosfato; FHL, linfocitosis hemofagocítica; LDL, lipoproteínas de baja densidad (*low density lipoproteins*); NK, células naturales asesinas (*natural killers*); NSF, factor sensible a la N-etilmaleimida (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*), ATPasa; Rab, GTPasa; SM, proteína producto del gen *Munch 18-1(sec/Much)*; SNAP, proteína soluble de unión al NSF (*soluble NSF attachment protein*) (*25kDa synaptosome associates protein*); SNARE, (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) receptor de SNAP; TNG, red trans Golgi; VAMP, proteína de membrana asociada a vesícula/sinaptobrevina; VSV, virus de la estomatitis vesicular; VSV-G, proteína del virus VSV.

■ Bibliografía consultada

- Bacaj, J., Pang, Z.P., Südhof, T.C. (2010). Testing the SNARE/SM protein model of membrane PNAS 107, 22365-22366.
- Balch, W.E., Dunphy, W.G., Braell, W.A., Rothman, J.E. (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. Cell 39, 405-416.
- Balch, W.E., Glick, B.S., Rothman, J.E. (1984). Sequential intermediates in the pathway of intercompartmental transport in a cell-free system. Cell 39, 525-536.
- Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T., Rothman, J.E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. Proc Natl Acad Sci USA 85, 7852-7856.
- Braell, W.A., Balch, W.E., Dobbertin, D.C., Rothman, J.E. (1984). The glycoprotein that is transported between successive compartments of the Golgi in a cell-free system resides in stacks of cisternae. Cell 39, 511-524.
- Bustillo-Merino, D., Gutiérrez-Martín, Y., Rodríguez Artalejo, A. (2009). La maquinaria molecular de la endocitosis. RANF, Monografía 29, pp 71-99. Madrid.

- Clary, D.O., Griff, I.C., Rothman, J.E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709-721.
- Eakle, K.A., Bernstein, M., Emr, S.D. (1988). Characterization of a component of the yeast secretion machinery: identification of the SEC18 gene product. *Mol Cell Biol* 8, 4098-4109.
- Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T., Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q and R-SNAREs. *PNAS USA* 95, 15781-15786.
- Fernández-Chacón, R., Königstorfer, A., Gerber, S.H., García, J., Matos, M.F., Stevens, C.F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., Südhof, T.C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410, 41-49.
- Fries, E., Rothman, J.E. (1980). Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 3870-3874.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., Südhof, T.C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717-727.
- Glick, B.S., Rothman, J.E. (1987). Possible role for fatty acyl-coenzyme A in intracellular protein transport. *Nature* 326, 309-312.
- Griff, I.C., Schekman, R., Rothman, J.E., Kaiser, C.A. (1992). The yeast SEC17 gene product is functionally equivalent to mammalian alpha-SNAP protein. *J Biol Chem* 267, 12106-12115.
- Hata, Y., Slaughter, C.A., Südhof, T.C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347-351.
- Kaiser, C.A., Schekman, R. (1990). Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61, 723-733.

- Malhotra, V., Orci, L., Glick, B.S., Block, M.R., Rothman, J.E. (1988). Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* 54, 221-227.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T.H., Rothman, J.E. (2000). Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407, 153-159.
- McMahon, H.T., Missler, M., Li, C., Sudhof, T.C. (1995). Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83, 111-119.
- Novick, P., Schekman, R. (1979). Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1858-1862.
- Novick, P., Field, C., Schekman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.
- Novick, P., Ferro, S., Schekman, R. (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25, 461-469.
- Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein secretion. *Science* 189, 347-358.
- Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R., Sudhof, T.C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260-263.
- Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H.T., Sudhof, T.C., Brose, N., Rosenmund, C. (2001). Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104, 71-81.
- Rizo, J. (2007). Proteínas SNARE. El corazón de la maquinaria de fusión intracelular. *Investigación y Ciencia*, Enero, pp. 31-32.
- Rohman, J.E. (2012). The future of Golgi apparatus research *Mol Biol Cell* 21, 3776-3780.

Scales, S.J., Bock, J.B., Scheller, R.H. (2000). The specifics of membrane fusion. *Nature* 407, 144-146.

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., Das-Gupta, B.R., Montecucco, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832-835.

Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.

Suton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., Brunger, A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.

Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J., Südhof, T.C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.

www.jolugar.webs.ull.es

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H., Rothman, J.E. (1998). SNARE pins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.

Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Kuang, W.J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ullrich, A., Rothman, J.E. (1989). A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast. *Nature* 339, 355-359.

Zierath, J.R., Lendahl, U. (2013). Karolinska Institutet. The Nobel Price Foundation.